

DAAD RISE weltweit 2016

Abschlussbericht

Optimizing unnatural amino acid mutagenesis in mammalian cells

Mareike Gabriele Bach

Institute: Karolinska Institutet, Solna, Sweden

Supervisor: Dr. Simon Elsässer

Date: 18.07.2016 – 23.09. 2016

Einleitung

In folgendem Bericht will ich von meinen Erfahrungen während meines DAAD-RISE worldwide Research Internship am Karolinska Institutet in Stockholm in der Gruppe von Simon Elsässer berichten. Der Bericht besteht aus einem Allgemeinen Teil, z.B. zum Thema Wohnungssuche in Stockholm, und einem fachlichen Teil, in dem ich kurz einige der Projekte und den Verlauf meines Praktikums darstellen möchte.

Allgemeiner Teil

Reisevorbereitung

Da für Schweden als Mitglied der EU kein Visum erforderlich ist, musste vor der Anreise lediglich die An- und Abreise sowie die Unterkunft geklärt werden.

Um von meinem Studienort (Greifswald) nach Stockholm zu gelangen, konnte ich zwischen Bahn, Bahn und Fähre, sowie dem Flugzeug wählen. Die günstigste, wenn auch nicht die umweltfreundlichste Alternative war am Ende der Flug mit Eurowings, da über die Deutsche Bahn zu der Zeit keine Züge in Schweden gebucht werden konnte.

Unterkunft

Eine Unterkunft in Stockholm zu finden ist nicht leicht. Im Vorfeld habe ich mich vor allem in den Facebook-Gruppen „Kungshamra“ und „Lappis“ nach Zimmern umgesehen, die für einen passenden Zeitraum untervermietet werden. Kungshamra und Lappis sind mit die größten Studentenunterkünfte und da Wohnraum in Stockholm rar und teuer ist, werden die Zimmer dort generell auch für kurze Zeit untervermietet. Leider blieb die Suche erfolglos, was zum einen am Reisezeitraum (Juli, August ist zwar Ferienzeit, aber im September geht die Uni schon wieder los) und auch an den übersteuerten Angeboten lag.

Mein Betreuer Simon hatte im Vorfeld vorgeschlagen sich über KI Housing um eine Wohnung zu bewerben. Für die Bewerbung brauchte ich einen „Official Invitation Letter“, den er mir auch direkt zuschickte. Die Ansage von KI Housing ist, dass sie sich melden, sobald sie etwas Passendes frei haben, aber falls man bis zum potentiellen Einzugsdatum nichts von Ihnen hört, erlischt die Bewerbung. Das half mir natürlich wenig weiter in Sachen Planungssicherheit, weshalb ich 2 Wochen vor Abflug dann auch schon mal mehr oder weniger verzweifelt auf Couchsurfing nach potentiellen Hosts für einige Tage schaute.

Glücklicherweise entdeckte ich dort eine Shared-house Initiative (Collective Sunshine, <http://www.collectivesunshine.se/>). In diesem Haus mit 12 Zimmer leben um die 12 Leute zusammen, das Haus ist großartig ausgestattet, mit allem was man zum Leben braucht, und hat sogar einen Garten mit Apfelbäumen und anderem Obst und Gemüse Normalerweise werden dort natürlich auch eher Leute genommen, die länger in Stockholm bleiben, aber nach meiner Bewerbung hatte ich Glück und jemand wollte mir sein Zimmer für 6 Wochen untervermieten. Im Endeffekt habe ich dann meine komplette Zeit in Stockholm in diesem Haus verbracht, da immer irgendein Zimmer für mich frei blieb.

Fortbewegung/Verkehrsmittel

Um vom Flughafen ins City Center zu gelangen kann man mit entweder mit den Flugbussen oder den Schnellzügen fahren, oder die günstigere (und deutlich längere) Variante nehmen, bei der man zuerst mit dem Bus fährt und dann in den Pendelzug umsteigt. Generell ist das öffentliche Verkehrsnetz sehr gut ausgebaut. Am besten kann man die Seite www.sl.se nutzen, um die schnellste Verbindung zu finden. Eine Monatskarte (ca. 700 SEK) lohnt sich auf jeden Fall. Mit dieser kann man den Bus, die Metro, Pendelzüge, Tram und sogar einige Fähren (Slussen, Djurgården, Skeppsholm) benutzen. Die besagte Monatskarte kann man sich dann auf seine access card laden. Wichtig: In den Bussen ist es nicht möglich Tickets zu kaufen. Man muss also schon vorher ein Ticket besorgt haben oder einen netten Busfahrer erwischen, der einen einfach so bis zur nächsten Bahn/Metrostation mitnimmt. Schön ist auch, dass man mit den sl-cards zum Teil recht weit in den Schärengarten fahren kann, z.B. mit dem Bus nach Vaxholm, ohne extra zu zahlen.

Laboralltag

Die Gruppe von Simon Elsässer ist Teil des Karolinska Institutets und liegt im Gebäude des Science for Life laboratory, in dem Arbeitsgruppen vom Karolinska Institutet, vom KTH und von der Stockholm University, sowie einige Firmen, untergebracht sind. Meine Arbeitsgruppe war eher klein, es gab aber eine Menge Master- und Sommerstudenten, mit denen ich auch in der Freizeit einiges unternehmen konnte. Die Arbeitsgruppe war sehr international, wobei wir mehrere Mitarbeiter aus Deutschland waren. Die Kommunikation im Labor lief weitestgehend auf Englisch.

Ausflugsziele

Es lohnt sich den Sonnenuntergang vom Ivar Los Park aus zu schauen, von dort hat man einen tollen Blick auf die Stadt. Ein Besuch in Grönalund ist fast ein Muss, den Eintritt zu Konzerten und dem Park selbst gibt es mit der Grönalundkort, die einmal gekauft für die ganze Saison gilt. Ich habe mir aber immer eine von Freunden geliehen, einfach mal rumfragen, wer gerade eine übrig hat. Die Achterbahnen selbst kosten extra, nach 19.00 Uhr gibt es aber einen günstigeren Tarif. Stockholm vom Wasser aus anzuschauen ist auch sehr schön. Es gibt ein Boot, das einem von der Nähe des Rathauses zum Schloss Drottningholm bringt, sowie unzählige andere Boote zu kleinen Schäreninseln oder für Sightseeing-Touren. Auch nett sind Kayaktouren. Besonders günstig ist es am Brunnsviken See, der dortige Kayakclub verleiht Kayaks und Kanus, es gibt sogar Studentenrabatt. Ein beliebtes Event ist auch der Wachwechsel, sonntags um 13 Uhr, sonst immer um 12 Uhr. Faszinierend ist, dass der Wachwechsel auch immer unterschiedlich von statten geht, mal zu Pferd, mal ohne und mit wechselndem Orchester.

Ich habe mich bemüht mittels Duolingo ein wenig Schwedisch zu lernen. Die Sprache ist für Deutsche recht einfach zu lesen, man versteht eigentlich direkt alle Straßenschilder usw. Man ist aber eigentlich recht wenig dazu gekommen sein Wissen anzuwenden, da die Schweden generell sehr gut Englisch sprechen und wir im Labor zum Beispiel nur sehr wenige Schweden hatten.

Schweden als Land und Arbeitsplatz hat mich in den 2,5 Monaten des Praktikums sehr begeistert. Nicht nur die angenehme Arbeitsatmosphäre in der Arbeitsgruppe von Simon, auch die Schönheit der Stadt Stockholm und der Natur rundherum werden mir sicher in Erinnerung bleiben.

Fachlicher Teil

Introduction

Unnatural amino acid mutagenesis, also known as amber suppression, is a technique, which is used to control and study proteins in living cells. The principle of the technique is to recode the amber stop codon into a regular codon, which then encodes for the unnatural amino acid. To achieve this, genes encoding an orthogonal aminoacyl-tRNA synthetase/tRNA_{CUA} pair are introduced into the target cell. Instead of reading the Stop codon as the end of the peptide chain, the tRNA_{CUA} carrying the unnatural amino acid is introduced and the peptide chain elongated. A system using the PylRS (encoded by *PylS*)/tRNA^{Pyl}_{CUA} (encoded by *PylT*) pair from *Methanosarcina mazei* has been used for genetic code expansion in this laboratory before¹.

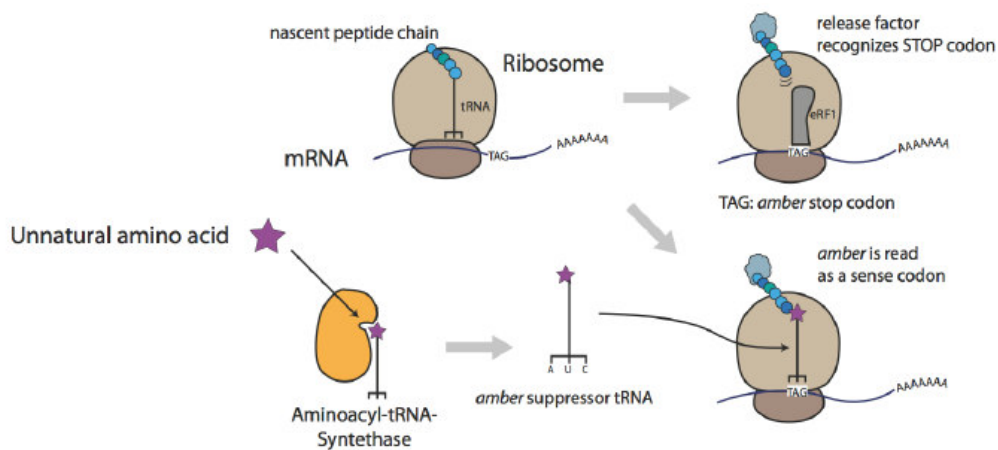


Figure 1: The principle of amber suppression showing the incorporation of an unnatural amino acid into a specific protein

During my time in the Elsässer lab I started with working on a small cloning experiment, as part of a larger PhD project, and then continued working on another small project, which has been started by a summer student and included the insertion of the amber stop codon into small peptide sequences and the transfection of mammalian cell lines with these constructs.

Project 1: Cloning experiment

For this small part of a bigger project I was responsible to clone a new construct, namely B100 (vector map shown in Figure 2), which consists of the E325 vector backbone and a fluorescent protein (called "Kohinoor") gene sequence with HA-tag from a genestring. Kohinoor is a reversibly photo switchable fluorescent protein (RSFP), whose fluorescence upon excitation at a certain wavelength, can be switched on or off by light in a reversible manner.² The fluorescence at 480 nm of Kohinoor in the construct was tested after transfection of HEK 293T cells. This construct will be used in the future as a vector backbone to investigate the protein Rpb1, a subunit of the RNA polymerase II using unnatural amino acid mutagenesis.

Project 2: Small peptides project

Before I took over the project, gene sequences of 13 small peptides with unknown function were collected via a literature research. Primers were designed for being able to extract the sequences out of cDNA via PCR. For each peptide sequence a reverse primer with HA-tag and a reverse primer without HA-tag were designed. The 26 constructs contained as well the Amber Stop codon. By using an unnatural amino acid (*N*-ε-(((2-methylcycloprop-2-en-1-yl)methoxy)carbonyl)-l-lysine, CpK) incorporated into the peptide chain, it was tested if the location within the cell of the small peptides can be tracked using SiR dye (Silicon rhodamine) or immunofluorescence.

Results

Project 1: Cloning experiment

The first part of the work involved the cloning of the Kohinoor gene string (ordered as an artificial gene sequence) into the vector backbone of E325. Therefore the vector E325 was digested with the restriction enzymes XbaI and NotI at 37 °C for one hour. The digested samples were analyzed using agarose gel electrophoresis, shown in Figure 3. As expected the vector digested with both restriction enzymes shows 2 clear bands at around 8200 Bp and 2000 Bp. The no restriction enzyme control shows only one band, which is slightly lower than the digested ones. This is due to the closed and supercoiled state of the plasmid, which travels faster through the electrophoretic field than the digested version. The one restriction enzyme control show only one single band, as expected.

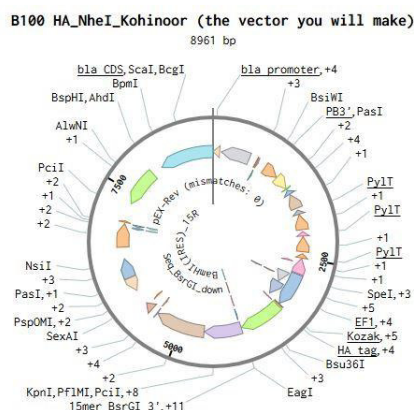


Figure 2: Plasmid map of the B100 construct containing the Kohinoor gene sequence

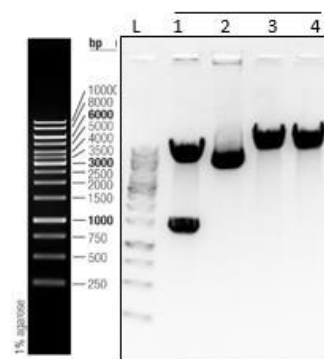


Figure 3: Agarose gelelectrophoresis of E325 vector digest
L: Marker; **1:** XbaI and NotI; **2:** no restriction enzyme; **3:** NotI; **4:** XbaI

The vector backbone (Figure 3, Lane 1, band at 8200 Bp) was extracted from the agarose gel using the Gel Purification kit of Thermo Fisher. Both ends of the genestring were designed to include an overlapping part between genestring and digested vector, so that the In-Fusion protocol could be used for ligation. In-Fusion ligated products were then transformed into *E. coli* Stbl3 cells. Two colonies were picked and used for inoculation of 5 ml overnight cultures. Plasmids were isolated using the Thermo Fisher MiniPrep kit and the Nanodrop was used to calculate the DNA content.

For confirmation of the obtained constructs a vector digest with XbaI and NotI was performed. The expected size of the new Kohinoor fragment was ca. 700 Bp smaller than the insert with mCherry and GFP from the E325 vector. As shown in Figure 4, the sizes of the bands seem to be correct.

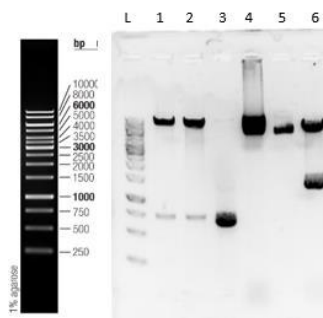
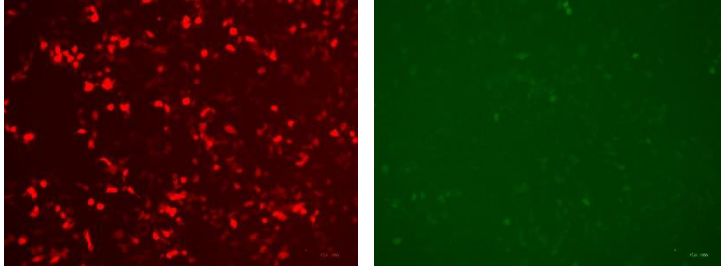


Figure 4: Agarose gelelectrophoresis of B100 vector digest
L: Marker; **1:** B100.1; **2:** B100.2; **3:** Genestring, no restriction enzymes; **4:** E325 no restriction enzymes; **5:** B100, no restriction enzymes; **6:** E325

To ensure again that the Kohinoor sequence had been inserted successfully, HEK293T cells were transfected with the obtained plasmids. After 48 h of incubation fluorescence at 415 nm was visible within the cells as shown in Figure 4B. The control E325 still contained the gene for mCherry, which resulted in a fluorescence at 610 nm (Figure 4A, first picture). The control showed as well a little bit of GFP fluorescence, caused by a read through of the stop codon (Figure 4A, second picture). As expected the B100 construct clearly shows more GFP fluorescence.

A



B

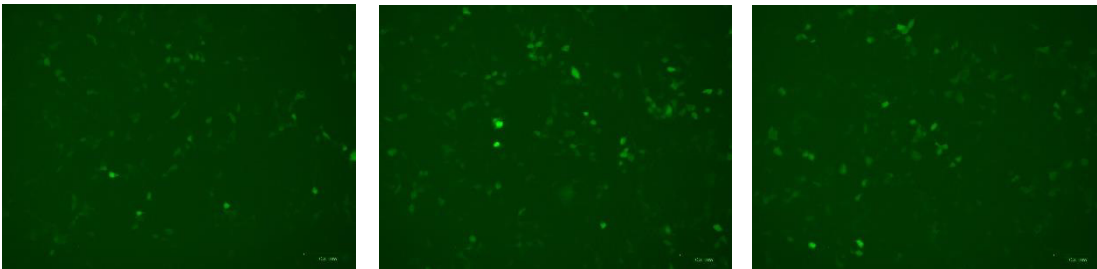


Figure 3: Fluorescence at 670 nm (A, first image) and 415 nm (A, second image; B)

All in all the HA-tagged Kohinoor sequence was successfully inserted into the E325 backbone. The new B100 construct can now be used for further experiments.

Project 2: Small peptides project

For this project 26 constructs were supposed to be cloned, 13 of them with and 13 without an additional HA-tag. The vector backbone used was Z077, which was digested with the restriction enzymes BspTI and NheI. The general cloning procedure was as follows:

- Create cDNA from HeLa RNA (Superscript III protocol)
- Amplification of gene of interest via PCR
- PCR Clean-up
- InFusion protocol (Ligation vector backbone and gene of interest)
- Transformation
- o/n cultures
- Plasmid isolation (MiniPrep)

After the first round of PCR not all peptides could be successfully amplified. The procedure was continued with the peptides showing a strong band at the correct size (Lane 1, 2, 5, 6, 11, 12, 15, 16, 17, 18; Figure 5). The bands of 4 constructs (Z204, Z209, Z217, Z222; Lane 3, 4, 19, 20; Figure 5) were gel purified and used for a second round of PCR for further amplification of the peptide of interest. The vector Z077 was digested with the restriction enzymes BspTI and NheI to receive the vector backbone for the In-Fusion protocol.

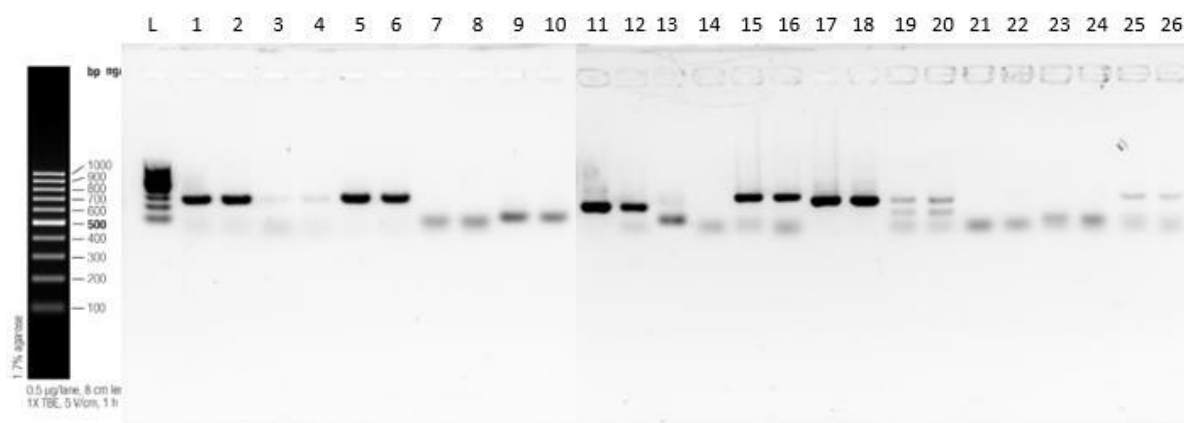


Figure 5: Agarose gelelectrophoresis, amplification of small peptides via PCR

L: Marker; **1:** Z208; **2:** Z221; **3:** Z209; **4:** Z222; **5:** Z210; **6:** Z223; **7:** Z211; **8:** Z224; **9:** Z212; **10:** Z225; **11:** Z200; **12:** Z213; **13:** Z201; **14:** Z214; **15:** Z215; **16:** Z216; **17:** Z203; **18:** Z217; **19:** Z204; **20:** Z218; **21:** Z205; **22:** Z219; **23:** Z206; **24:** Z219; **25:** Z207; **26:** Z220

The In-Fusion product was transformed into homemade chemical competent *E. coli* Stbl3 cells. These cells were not efficient (no colonies on the plates), so that the transformation was repeated using commercial competent *E. coli* Stellar cells with a higher transformation efficiency. This resulted in colonies on all 18 plates. 5 ml of LB medium containing Ampicillin as a selection marker were inoculated with colonies from the plates for overnight cultures. Plasmids were isolated using the MiniPrep kit from Thermo Fisher.

For confirmation of the obtained constructs a vector digest with BspTI and NheI was performed. In the end 9 constructs were successfully cloned and confirmed via restriction digest, shown in Figure 6. 5 other constructs were obtained, but not yet confirmed via restriction digest.

Number	Description	Selection	Details
Z200	TMSB10	Amp	Restriction digest: confirmed
Z202	POLR2L	Amp	Restriction digest: confirmed
Z203	COX7C	Amp	Restriction digest: confirmed
Z212	MOTSC	Amp	Restriction digest: confirmed
Z215	POLR2L-HA	Amp	Restriction digest: confirmed
Z216	COX7C-HA	Amp	Restriction digest: confirmed
Z221	HSBP1-HA	Amp	Restriction digest: confirmed
Z223	CRIP1-HA	Amp	Restriction digest: confirmed
Z225	MOTSC-HA	Amp	Restriction digest: confirmed
Z204	MRPL33	Amp	
Z209	TRIAP1	Amp	
Z217	MRPL33-HA	Amp	
Z222	TRIAP1-HA	Amp	
L027	Orf0_R44TAG	Amp	

Figure 5: Overview of obtained constructs during this project

The confirmed constructs were used for transfection of HeLa Fucci cells and HEK 293T cell (Figure 6). The procedure for staining and Immunofluorescence still need to be optimized.

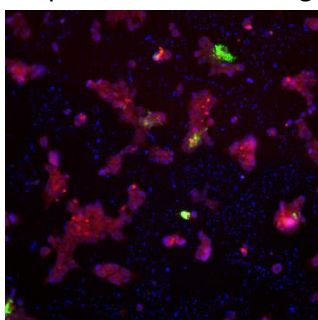


Figure 6: Immunofluorescence for the construct Z223 (CRIP1-HA) in HEK 293T cells

The overlay includes the DAPI nuclear DNA stain (blue, Emission at 462 nm), the SIR dye stain (red, Emission at 650-670 nm) and the goat anti-mouseAlexa 488 (green, Emission at 525 nm)

Discussion

If there was more time, it might have been an option to try a genomic PCR for the rest of the constructs, where the PCR did not work out yet. Other peptides from the literature research could as well be selected for investigation. The obtained and confirmed constructs need to be send for sequencing. The transfection and fixation process need to be optimized, as well as the IF procedure. Another option for high resolution pictures would be the use of the confocal microscope.

References

1. Elsasser, S. J., Ernst, R. J., Walker, O. S. & Chin, J. W. Genetic code expansion in stable cell lines enables encoded chromatin modification. *Nature methods* **13**, 158–164 (2016).
2. Tiwari, D. K. *et al.* A fast- and positively photoswitchable fluorescent protein for ultralow-laser-power RESOLFT nanoscopy. *Nature methods* **12**, 515–518 (2015).



Thanks for having me in the lab!